

研究題目 EB ウイルス感染不死化B細胞に発現するT細胞エピトープの同定

研究組織

研究代表者：山崎 晶（大阪大学微生物病研究所）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：石川 絵里（大阪大学微生物病研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

我々は、EB ウイルス感染により不死化した自家 B 細胞（EBV-LCL）に反応するヒト TCR クロノタイプと、その拘束性 HLA を複数見出し、当該 TCR が EBV 由来抗原ではなく、EBV 感染・不死化によって新たに発現するようになった自己抗原を認識することを示唆する結果を得た。本研究では、質量分析により抗原エピトープを同定し、当該 TCR を発現する T 細胞の機能を明らかにすることを目的とした。

当該 TCR は、自家 B 細胞由来 EBV-LCL のみでなく、拘束性 HLA を導入した数種類の培養細胞にも応答が見られたため、質量分析により、応答が見られる培養細胞と応答が見られない培養細胞上の拘束性 HLA に提示されるペプチドの比較解析を行った。その結果、抗原エピトープ候補と考えられる、いくつかのペプチドが見出された。

[1-2]研究の方法・経過

共培養した際、当該 TCR を導入したレポーター細胞の応答が見られる拘束性 HLA 発現培養細胞は、当該 TCR が認識する抗原を発現しているものと考えられる。そこで、応答が見られる培養細胞と応答が見られない培養細胞上の拘束性 HLA に提示されているペプチドを精製するため、3xFlag タグを付加した拘束性 HLA を導入し、タグ特異的抗体を用いて免疫沈降を行った。N 末にタグを付加したものより、C 末にタグを付加した HLA の方が免疫沈降の効率が良かったため、以後 C 末 3xFlag 付加 HLA class II を導入した細胞を用いることとした。抗 Flag 抗体磁気ビーズによる免疫沈降後、酸溶出あるいは、トリフルオロ酢酸/アセトニトリル溶出し

たサンプルを、限外ろ過カラムを用いて分画し、ペプチドが含まれると考えられる 10 kDa 以下の画分について質量分析を行った。de novo ペプチドシーケンシングにより、得られたペプチド配列を同定した。当該 TCR の応答が見られない培養細胞に比べ応答が見られる細胞で多く検出され、さらに応答が見られた EBV-LCL で発現の高い遺伝子由来のペプチド、かつ拘束性 HLA への提示が予測されるペプチドを抗原エピトープ候補として絞り込みを行った。絞り込んだ候補ペプチドを合成し、当該 TCR の応答が見られるか否か検討を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

導入した C 末 3xFlag 付加 HLA から溶出したペプチドについて質量分析を行った結果、12 残基以上のペプチドが 12 残基以下のペプチドに比べ多く検出された（図 1）。この結果は、HLA class II に提示されるペプチド長が 12-20 残基であることを考えると、妥当な結果と考えられた。

当該 TCR は、正常な自家 B 細胞には反応せず、EBV 感染・不死化した自家 B 細胞（EBV-LCL）にのみ応答したことから、RNA-seq 解析により各細胞の遺伝子発現を比較した。この結果を元に、質量分析において応答が見られる培養細胞で多く検出されたペプチドから、EBV-LCL で発現が高い遺伝子由来のペプチドに絞り込んだ。さらに、HLA class II 結合予測ツールを用いて、拘束性 HLA に提示されるペプチドを候補ペプチドとして絞り込みを行い、得られた数十種類の候補ペプチドを合成し、当該 TCR の応答が見られるか否か検討を行った。しかし現在までのところ、いずれも応答が見られず、エピトープ同定には至っていない。

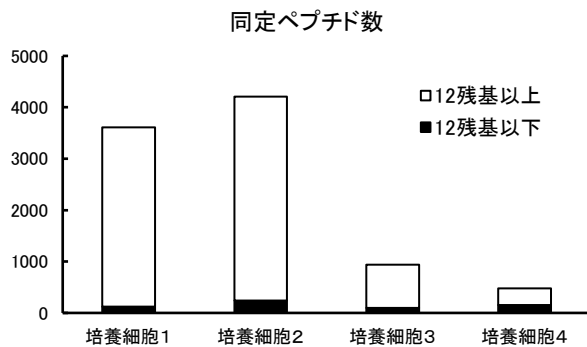


図1 質量分析により同定されたペプチドの内訳

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

EBV は感染率の非常に高いウイルスであり、EBV-LCL は健常人では排除される一方、骨髄移植を含めた臓器移植後の免疫抑制剤投与時や原発性免疫不全および AIDS 患者においては、B 細胞リンパ腫へと移行することが知られている。また、加齢に伴う免疫能低下によると考えられる EBV 関連 B 細胞リンパ腫や、EBV 再活性化に伴う自己免疫疾患の発症も知られており、EBV-LCL 特異的 T 細胞はその制御に重要な役割を担っていると考えられる。本共同研究では未だ抗原エピトープの同定には至らなかったが、EBV-LCL 特異的 TCR クロノタイプおよび抗原の同定とその機能解析は、EBV 関連疾患の制御に繋がることが期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

該当なし

[3-2] 学会発表

該当なし

[3-3] 成果資料等

該当なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同研究による質量分析、および RNA-seq 解析の結果を組み合わせ、数十種類の抗原エピトープ候補が見出されたが、残念ながらいずれもエピトープではないと考えられる結果であった。質量分析前にペプチドの絞り込みを行うことが必要と考え、今後は、拘束性 HLA に提示されているペプチドを溶出後、HPLC により分画し、各画分に対する当該 TCR の応答を見ることにより候補ペプチドの絞り込みを行う

予定である。さらに活性の見られる画分が得られた際には、当該画分を質量分析により解析し、エピトープの同定を目指す。また、エピトープによる刺激を行うことにより、当該 TCR を発現する T 細胞の機能を明らかにしたいと考えている。